

AKTIVITAS ANTIFUNGI EKSTRAK TANAMAN OBAT NAN *FEI SHU* TERHADAP *Candidaalbicans*

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF NAN *FEI SHU* HERBAL MEDICINE AGAINST *Candidaalbicans*

Catherine Tiara Suwignyo¹ Bernardus Boy Rahardjo Sidharta² Ignasius Pramana Yuda³
^{1,2,3}*Fakultas Teknobiologi Atma Jaya Yogyakarta, Jl. Babarsari No. 44 Yogyakarta*
¹*cath.kath@gmail.com*

Abstrak

Penyakit kulit umumnya terjadi akibat infeksi fungi dengan sebagian besar kasus disebabkan oleh *Candida* spp terutama *Candida albicans*. Pengobatan infeksi oleh *Candida albicans* mengalami kendala karena resistensinya terhadap beberapa obat antifungi sintetis. Meski demikian, beberapa ekstrak tanaman obat menunjukkan adanya aktivitas antifungi terhadap *Candida albicans*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antifungi dari ekstrak tanaman obat *Nan Fei Shu* terhadap *Candida albicans*. Ekstrak diperoleh menggunakan metode maserasi dengan pelarut diklorometana. Pengujian fitokimia terhadap ekstrak menggunakan KG-SM menunjukkan komponen utama dari 50 komponen senyawa yang terdeteksi, yakni fitol (15,397%), neophytadiene (14,333%), dan heneicosane (11,009%). Pengujian farmakologi melalui uji zona hambat dengan metode difusi keping menunjukkan tidak adanya daya hambat dari ekstrak dengan konsentrasi 25, 50, 100, dan 200 mg/ml. Perdagangan tanaman obat yang tidak termonitor memunculkan berbagai nama lokal untuk suatu spesies tanaman obat. Identifikasi tanaman obat yang keliru dapat beresiko pada kesehatan pengguna obat tradisional. Oleh karenanya, diperlukan metode identifikasi spesies yang cepat dan akurat, yakni identifikasi molekuler. Identifikasi secara molekuler menunjukkan tanaman obat *Nan Fei Shu* merupakan spesies *Vernonia amygdalinum*.

Kata kunci: *Nan Fei Shu*, *Vernonia amygdalina*, *Candida albicans*, Uji Zona Hambat, Identifikasi Molekuler

Pendahuluan

Penggunaan obat tradisional di Indonesia telah berlangsung secara temurun sejak ribuan tahun karena keanekaragaman hayati yang tinggi memiliki potensial bahan alam untuk dijadikan obat tradisional oleh masyarakat di Indonesia (Dewoto, 2007). Tanaman obat *Nan Fei Shu* dipercaya oleh masyarakat Indonesia dapat mengobati penyakit darah tinggi, diabetes, ginjal, pengapuran tulang, seperti yang diungkap oleh Staf Lapangan Taman Nasional Gunung Gede Pangrango, Ujang Edi (Xiang, 2014). Pengakuan sejumlah media massa (Natur Indonesia, 2012; Xiang, 2014) belum ditemukan laporan dari peneliti akademis

di Indonesia dan keterangan mengenai khasiat hanya berdasarkan pengalaman pengguna *Nan Fei Shu*.

Staf Lapangan Taman Nasional Gunung Gede Pangrango, Ujang Edi, menyampaikan daun *Nan Fei Shu* dapat menyembuhkan penyakit kulit (Xiang, 2014). Keterangan masyarakat mengenai khasiat untuk mengobati penyakit kulit perlu dikaji lebih lanjut keabsahannya secara ilmiah. Infeksi kulit umumnya menjadi penyebab penyakit kulit dengan sebagian besar infeksi akibat *Candida* spp terutama yakni *Candida albicans* (Aly, 2001; Mohandas dan Ballal, 2011; Pasteur dkk., 2011; Chen dkk., 2006; Pfaller dkk., 2011). *Candida albicans* menunjukkan resistensi terhadap beberapa obat antifungi namun komponen terpenoid mampu secara efektif menghambat (Rao dkk., 2010).

Terpenoid merupakan produk kondensasi dari unit C5 isoprena yang menjadi komponen utama dalam minyak atsiri dan dapat diperoleh melalui metode ekstraksi menggunakan pelarut (Zore dkk., 2011; Robinson, 1995). Spesies *Vernonia* memiliki komponen seskuiterpenoid yang khas yakni vernolide; vernodalinol; vernodalol; 11,13-dihydrovernodalin; vernodalin; vernomygdin; dan hydrocyvernolide (Luo dkk., 2011). Skrining farmakologi ekstrak perlu dilakukan secara spesifik terhadap aktivitas antifungi *Candida albicans* secara cepat menggunakan metode uji zona hambat dengan difusi keping (*disc diffusion assay*) (Devkatte dkk., 2005; Obistioiu, 2014). Skrining fitokimia ekstrak menggunakan kromatografi gas – spektroskopi massa (KG-SM) untuk mendeteksi keberadaan komponen senyawa yang mendukung aktivitas antifungi (Harbourne, 1987; dePapua dkk., 1999; Obistioiu dkk., 2014).

Nilai ekspor obat herbal Indonesia pada tahun 2013 mencapai US\$ 23,44 juta dan mengalami peningkatan 600% pada tahun 2014 hingga mencapai US\$ 29,13 juta (Direktorat Jenderal Pengembangan Ekspor Nasional, 2014). Meski demikian, pasar tanaman obat begitu besar dan pesat tetap tidak termonitor (dePapua dkk., 1999). Perdagangan tanaman obat yang

tidak termonitor memunculkan berbagai nama lokal untuk suatu spesies tanaman obat (Kool dkk., 2012), salah satunya tanaman obat *Nan Fei Shu*. Identifikasi tanaman obat yang keliru dapat beresiko pada kesehatan pengguna obat tradisional (Kool dkk., 2012). Oleh karenanya, diperlukan identifikasi spesies yang cepat dan akurat, yakni identifikasi secara molekuler (Wallerger dkk., 2012). Identifikasi tanaman obat *Nan Fei Shu* menggunakan Primer ITS karena memiliki akurasi identifikasi hingga tingkat genus (Kool dkk., 2012).

Metode Penelitian

Penelitian aktivitas antifungi dilakukan di Laboratorium Teknobiologi-Industri, Fakultas Teknobiologi, Universitas Atma Jaya Yogyakarta dan identifikasi komponen senyawa dalam ekstrak di Laboratorium Terpadu, UIN Sunan Kalijaga Yogyakarta. Penelitian identifikasi molekuler tanaman obat *Nan Fei Shu* dilakukan di tiga lokasi terpisah: (1) Ekstraksi DNA dilakukan di Laboratorium BioMolekuler, Fakultas Teknobiologi, Universitas Atma Jaya Yogyakarta, (2) Amplifikasi DNA dan Purifikasi DNA di Laboratorium Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Kampus Kamphaeng Saen, Universitas Kasetsart, Thailand dan (3) Sekuensing DNA di Laboratorium Satu Basa (*First Base Laboratories*), Malaysia.

Alat yang digunakan pada penelitian ini yakni gelas beker, erlenmeyer, pengaduk gelas, ayakan mesh 20, nampan aluminium, *cling wrap*, aluminium foil, timbangan, gelas ukur, blender, corong, korek api, termometer, *rotary evaporator*, pipet ukur, propipet, pipet tetes, *microtube*, *coverslip*, *slip*, mikroskop, tisu, inkubator, petridish, erlenmeyer, gelas pengaduk, pembakar spiritus, kapas, kertas payung, tabung reaksi, korek api, jarum ose, trigalski, filter paper *whatmann* No. 41, gunting, pensil, timbangan elektrik, mikropipet, pinset, *lamina air flow (LAF)*, kompor, spektrofotometer UV-VIS, *waterbath*, sentrifugasi, mikrosentrifugasi, mini sentrifugasi, vorteks, tip 1000µl, tip 200µl, tip 20µl, mortar, tempat

pembuangan tip, *microtube rack*, *freezer*, *microwave*, inkubator *drybath*, erlenmeyer, *thermocycler*, *comb set*, elektroforesa, *gel elution kit*, dan transluminator.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yakni daun tanaman obat *Nan Fei Shu*, DMSO, diklorometana, dekstrosa, pepton, *yeast extract*, agar *bacteriological*, aquades, BaCl_2 , H_2SO_4 1%, ketoconazole 200 mg, alkohol 70%, *buffer* ekstraksi, *chloroform:isoamyl*, isopropanol, *TE buffer*, etanol 70%, etanol absolut 95%, primer ITS 1 dan 4, MgCl_2 , dNTP, *Taq buffer with KCl*, *Phusion Hot Start II High Fidelity DNA Polymerase*, *agarose gel powder* 1,5%, *TE buffer*, *TBE buffer*, *TA buffer*, *GeneRuler* 100 bp plus, dan *GelStain SYBR safe*.

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan perlakuan sampel berupa variasi konsentrasi ekstrak, 25, 50, 100, 200 mg/ml. Perlakuan tersebut akan dilakukan lima (5) kali pengulangan dengan kontrol positif dan kontrol negatif secara berurutan yakni ketoconazole 1% (b/v) dan DMSO. Sampel ekstrak yang diperoleh akan diujikan pada *Candida albicans*.

Simplisia daun tanaman obat *Nan Fei Shu* akan dikeringkan dengan metode pengeringan udara. Ekstraksi simplisia menggunakan metode maserasi dengan pelarut diklorometana. Evaporasi pelarut menggunakan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak berupa pasta. Ekstrak dilakukan skrining senyawa menggunakan KG-SM dan dilanjutkan pengujian aktivitas antifungi melalui uji zona hambat dengan metode difusi keping. Identifikasi penamaan ilmiah tanaman obat *Nan Fei Shu* dilakukan dengan mensekuensing DNA yang diisolasi dari simplisia kemudian sekuens DNA di *blast* dan *alignment* antara sekuens DNA dan sekuens hasil *blast*.

Hasil dan Pembahasan

A. Ekstraksi

Penelitian ini menggunakan daun dari *Nan Fei Shu* yang diperoleh dari kebun kultivasi di Yogyakarta. Pemetikan dilakukan pada daun tanaman obat *Nan Fei Shu* segar berumur 20-30 hari dengan ukuran 10-15 cm sebab senyawa terpenoid terakumulasi pada sitoplasma sel dalam jumlah banyak pada saat daun mencapai perkembangan optimal (Gershenzon dkk., 2000). Simplisia dikeringkan menggunakan metode pengeringan udara agar senyawa volatil termolabil terawetkan secara optimal (Abascal dkk., 2005). Bobot simplisia berkurang akibat pengeringan udara mencapai 19,33% dari bobot awal 4 kg menjadi bobot akhir 773 gram.

Ekstraksi dilakukan menggunakan larutan diklorometana sebab sifatnya yang non-polar mampu mengekstraksi senyawa terpenoid yang merupakan senyawa atsiri bersifat lipofilik (Harbourne, 1987; Houghton dan Raman, 1998; Cowan, 1999; Supriyatna dkk., 2015). Senyawa terpenoid dapat menurun kestabilannya dengan perlakuan suhu selama proses ekstraksi (Zwenger dan Basu, 2008). Oleh karena itu, ekstraksi dilakukan selama 4 hari dalam suhu ruang (27°C) kemudian difilter dan diperoleh filtrat sebanyak 14 ml. Pelarut yang terkandung dalam filtrat dievaporasi pada suhu 40°C dikarenakan pelarut diklorometana memiliki titik didih yakni 39,8°C dan untuk mencegah senyawa volatil menurun kestabilannya (Zwenger dan Basu, 2008; Pittsburgh Plate Glass, 2003). Ekstrak berupa pasta berwarna hijau gelap dengan bobot gram 1,895 gram.

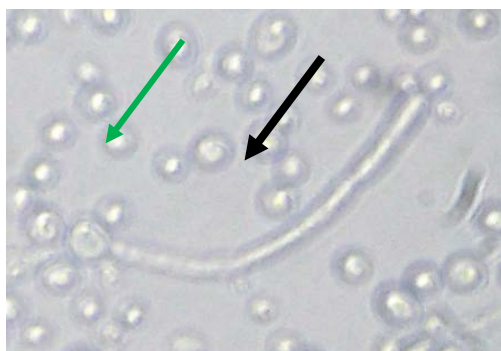
B. Identifikasi Komponen Senyawa

Hasil kromatogram ekstrak diklorometana Tanaman Obat *Nan Fei Shu* menunjukkan adanya 50 komponen senyawa yang terdeteksi. Komponen utama dalam ekstrak diantaranya fitol (15,397%), neophytadiene (14,333%), dan heneicosane (11,009%). Terpenoid ditemukan dalam bentuk diterpenoid (fitol) dan seskuiterpenoid (neophytadiene) dengan total 29,73% dari ekstrak.

Alkana, menempati posisi kedua sebagai golongan senyawa yang banyak didapati yakni sebesar 21,264% dari ekstrak dalam bentuk *acyclic alkane*, diantaranya heneicosane. *Fatty acyls* berupa asam lemak, diantaranya asam heksadekanoat (8,959%) dan asam lineoleat/asam 9,12-oktadekadienoat (8,571%) ditemukan dalam ekstrak dengan total 17,53%. Senyawa golongan steroid ditemukan pula pada ekstrak, yakni chondrillasterol sebesar 3,015%. Alfa-tokoferol dan beta-tokoferol sebagai antioksidan dalam golongan fenol yang larut lemak (Palozza dan Krinsky, 1992) ditemukan pada ekstrak, secara berurutan yakni sebesar 1,26% dan 0,86%.

C. Pengujian Aktivitas Antifungi terhadap *Candida albicans*

Pengujian aktivitas antifungi terhadap *Candida albicans* dilakukan dengan metode zona hambat menggunakan difusi keping sesuai dengan dokumen M44-A oleh *The National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) (2004). Kultur *Candida* yang digunakan pada pengujian ini diperoleh dari Balai Kesehatan Yogyakarta (BLK) dengan nomor strain *Candida albicans* ATCC 10231. Pengujian kemurnian dilakukan menggunakan YEPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*), dan menunjukkan keberadaan *germ tubes* *Candida albicans* ditunjukkan pada Gambar 1 berikut.



Gambar 1. *Germ tube Candida albicans* (ditunjuk anak panah hitam) dan blastospora (ditunjuk anak panah hijau) dengan perbesaran x450 medium YEPD (Sumber: dokumentasi pribadi)

Germ tube merupakan bentuk transisi blastospora yang akan berkembang membentuk hifa dan tampak sebagai filamen perpanjangan blastospora (Molero dkk., 1998; Larone, 1995). Pembentukan *germ tube* khas dimiliki *Candida albicans* karena sifatnya yang dimorfik mampu membentuk *yeast* (kapang) yang *ellipsoidal* maupun miselium (Molero dkk., 1998; Kim dkk., 2002).

Hasil pengamatan zona hambat dianalisis variasi (ANOVA) menggunakan SPSS v.20 dengan tingkat kepercayaan 95% dan analisis variasi menunjukkan adanya bedanya secara signifikan. Analisis DMRT selanjutnya dilakukan untuk melihat letak beda nyata yang ditunjukkan pada Tabel 1 berikut.

Tabel 1. Hasil Analisis Luas Zona Hambat (cm²) Aktivitas Antifungi Ekstrak Tanaman Obat *Nan Fei Shu*, Ketoconazole 1% (^b/_v), dan DMSO terhadap *Candida albicans*.

Perlakuan	Luas Zona Hambat (cm ²)
DMSO	0 ^a
25 mg/ml	0 ^a
50 mg/ml	0 ^a
100 mg/ml	0 ^a
200 mg/ml	0 ^a
Ketoconazole 1% (^b / _v)	11,449 ^b

Analisis rerata DMRT menunjukkan ketoconazole memiliki daya hambat terhadap *Candida albicans* sebesar 11,449 cm² dan secara signifikan berbeda nyata dengan zona hambat ekstrak tanaman obat *Nan Fei Shu* dan DMSO. Perlakuan ekstrak 25, 50, 100, dan 200 mg/ml menunjukkan daya hambat yang tidak signifikan terhadap *C. albicans*. Pelarut DMSO tidak memberikan daya hambat terhadap *Candida albicans* sehingga pelarut tidak memengaruhi hasil uji yang diperoleh dari ekstrak tanaman obat *Nan Fei Shu*.

Hasil pengujian aktivitas antifungi oleh ekstrak tidak sesuai dengan hipotesis. Studi oleh Bucar dkk. (2013) menyebutkan bahwa pengujian biologis secara *in vitro* maupun *in vivo* harus dilakukan setelah ekstrak melalui proses purifikasi melalui metode kromatografi cair. Hal ini bertujuan untuk mengurangi interupsi yang terjadi antar komponen lain yang terkandung dalam ekstrak dan meningkatkan konsentrasi senyawa aktif. Obistioiu dkk. (2014) menyampaikan bahwa konsentrasi komponen senyawa aktif antifungi yang rendah akan mengurangi aktivitas antifungi.

Interupsi komponen senyawa dapat berupa kehadiran senyawa dalam ekstrak yang justru mendukung *Candida albicans* untuk memperbaiki membran dan beregenerasi seperti asam lemak linoleat, asam palmitat, dan sterol. Murayama dkk. (2006) menyatakan asam lemak tidak jenuh berantai panjang seperti asam linoleat (C18:2) dan asam gamma-linoleat (C18:3) merupakan komponen utama membran *Candida albicans* yang secara alami diproduksi. Sarachek dan Higgins (1972) menemukan bahwa keberadaan komponen sterol dan asam lemak rantai panjang seperti asam palmitat mendukung pemulihan *Candida albicans* pasca kerusakan letal oleh UV maupun antifungi yang spesifik pada membran sel, dengan penyusunan kembali struktur sel membran yang kritis untuk mengawali pembelahan sel.

Aspek metode pengujian juga turut dipertimbangkan, seperti penggunaan medium sabouraud dekstroza agar (SDA). Yucesoy dkk. (2001) menyatakan medium RPMI 1640 memberikan hasil uji difusi keping yang lebih sensitif (93%) dalam inkubasi 24 jam dibandingkan medium SDA. Penggunaan medium SDA akan mendukung koloni untuk pulih pasca paparan antifungal lebih cepat dibandingkan pada medium RPMI 1640 karena ketersediaan nutrisinya yang berlimpah (Shu dkk., 2001). Oleh karenanya diameter zona hambat pada medium SDA lebih kecil dibandingkan pada medium RPMI (Yucesoy dkk. 2001).

Adapun aspek mikroorganisme sendiri, yakni *Candida albicans* dengan mekanisme resisten agen antifungi berasal dari mutasi genetik yang dialami mikroorganisme (Cannon dkk., 2007). *American Type Culture Collection* (2014) menyebutkan subkultur direkomendasikan tidak lebih dari 5 kali dari kultur *genuine* ATCC, karena pengulangan transfer kultur (subkultur) dengan penyimpanan kultur pada suhu 4°C dapat menyebabkan mutasi spontan. Mutasi spontan berupa delesi dan duplikasi pada beberapa pasangan basa akibat kesalahan replikasi DNA dapat menghasilkan DNA rekombinan yang berpotensi memiliki gen resistensi (Griffiths dkk., 2000). Sementara, kultur yang diperoleh dari BLK merupakan subkultur yang tidak tercatat repetitif kesekian.

D. Identifikasi Tanaman Obat *Nan Fei Shu* secara Molekuler

Sekuens DNA tanaman obat *Nan Fei Shu* diperoleh dalam dua sekuens menurut primernya. Sekuens pertama diperoleh dari primer ITS 1 dengan kode 1705843, sekuens memiliki panjang 686 bp, sementara sekuens kedua diperoleh dari primer ITS 4 dengan kode 1702351, sekuens memiliki panjang 589 bp. Sekuens konsensus yang diperoleh dari kedua sekuens tersebut memiliki panjang 585 bp.

Hasil blast sekuens di NCBI GenBank menunjukkan adanya kesesuaian 99%, nilai E (Ekspektasi) 0,0 (signifikan), maksimal skor 1033 dari total skor 1033, dan 97% sekuens tercakup dan *teralignment* (*Query coverage*) dengan sekuens *Gymnanthemum amygdalinum* dengan nomer akses AY504695.1. Berikut sekuens *Gymnanthemum amygdalinum* yang diperoleh dari NCBI GenBank (fasta format).

```
TCGATTAAAGCATTTCAGAATAACCTGTGAACATGTATTATTATTTGGGTG
TTGGGAGGACGGGCTAATGCTCTCACCTCTTTGCATCGTGTTGACATACA
CTTGTATAGCCTCTTWTTGGGTCGTACATGTGTCTTGTTAGCATTTAAACA
AACCCCGGCACAGAACGTGCCAAGGATGAACAAAACATTAAAAGGGTGC
GACTTGTGATGCCCCGTTTCGCGGTATGCATTCAGGTCGTGGCTTTTTTGTA
```

TTACAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGA
 ACGTAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCAT
 CGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATTTGGTCGAGGGGCACGTC
 TGCCTGGGCGTCACGCATTGCATCGCCTCCTTCAATGCCTCCTTCCTTAGTA
 GGCTTGTTGTTTCGGGGCGGAGATTGGTCTCCCATGCTGATGGTGTGGTTGG
 CCTAAACGTAACCTCCCTTTCGGTGGATACATGACTAGTGGTGGTTGACAAG
 ACCTTCGTTTGGAGTTGTGTGTCGTTAACCGTAAGGGAAAGGTTGTAAAAA
 TCCCTTAATGAGTCGTCTTATGATGACGCTTCGA

Barcode tanaman obat *Nan Fei Shu* teridentifikasi sebagai sekuens *Gymnanthemum amygdalinum*, hal ini menunjukkan tanaman obat *Nan Fei Shu* adalah nama lokal yang diberikan atas spesies *Gymnanthemum amygdalinum*. *Gymnanthemum amygdalinum* (Delile) Sch.Bip. ex Walp. dikenal pula dengan nama spesies *Vernonia amygdalina* Delile (Duarte dan Silva, 2013). *Gymnanthemum amygdalinum* (Delile) Sch. Bip. ex Walp. merupakan penamaan yang disahkan pada tahun 1843, dengan penamaan sebelumnya pada tahun 1829 yakni *Vernonia amygdalina* Delile, Cent. Pl. Afr., Voy. Bot. Meroe (Hanelt, 2001). Meski demikian, penamaan *Vernonia amygdalina* lebih umum digunakan, dePapua dkk. (1999) dalam bukunya *Plant Resources of South East Asia* No 12 Jilid 1 menulis artikel mengenai genus *Vernonia* namun tidak ditemukan artikel mengenai genus *Gymnanthemum*. Spesies *G. amygdalinum* termasuk dalam famili Asteraceae, subfamili Cichorioideae, suku Vernonieae, dan sub suku Gymnantheminae (United States Department of Agriculture, 2015).

Simpulan

1. Ekstrak tanaman obat *Nan Fei Shu* tidak memiliki aktivitas antifungi terhadap *Candida albicans*.
2. Penamaan ilmiah tanaman obat *Nan Fei Shu* yakni *Gymnanthemum amygdalinum* atau *Vernonia amygdalina*.

Saran

1. Ekstrak *crude* perlu dilakukan purifikasi atau isolasi dengan kromatografi cair seperti HPLC untuk mendapatkan senyawa aktif murni sebelum pengujian *in vitro*, sehingga hasil uji akan fokus pada daya hambat oleh senyawa aktif terhadap mikroorganisme uji.
2. Kultur yang digunakan untuk pengujian aktivitas antifungi direkomendasikan berasal dari *genuineAmerican Type Culture Collection* dan selanjutnya penggunaan kultur maksimal berasal dari subkultur *genuineAmerican Type Culture Collection* (ATCC) yang kelima.
3. Ekstraksi perlu dilakukan dari bahan simplisia segar menggunakan metode perkolasi dengan pelarut nonpolar seperti petroleum eter dan heksana terhadap *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, dan *Aspergillus flavus*.

Ucapan Terimakasih

Terimakasih kepada Profesor Worawidh Wajjwalku atas peminjaman fasilitas Laboratorium Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Kampus Kamphaeng Saen, Universitas Kasetsart, Thailand dan dukungan dana untuk sekuensing di *First Base Laboratories* Malaysia.

Daftar Pustaka

- Abascal, K., Ganora, L., Yarnell, E. 2005. The Effect of Freeze drying and its Implications for Botanical Medicine: A review. *Phytother.* 19:665-660.
- Aly, R. 2001. Skin, Hair, and Nail Fungal Infections. *Infectious Disease in Clinical Practice.* 10(2): 117-122.
- American Type Culture Collection. 2014. *FAQ: Subculture Bacterial Strains.* <http://www.atcc.org/Global/FAQs/7/3/Subculture%20bacterial%20strains-129.aspx>. Diakses tanggal 20 Agustus 2015.
- Bucar, F. Wube, A., dan Schmid, M. 2013. Natural Product Isolation - How to Get from Biological Material to Pure Compounds. *Nat.Prod.Rep.* 30: 525-545.

- Cannon, R.D., Lamping, E., Holmes, A.R., Niimi, K., Tanabe, K., Niimi, M., dan Monk, B.C. 2007. *Candida albicans* drug resistance – Another Way to Cope With Stress. *Microbiology*. 153:3211-3217.
- Chen, S. Slavin, M., Nguyen, Q. 2006. Australia Candidemia Study: Active Surveillance for Candidemia. *Emerg Infect Dis*. 12(10):1508-1516.
- Cowan, M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:564-582.
- dePapua, L.S., Bunyaprophatsara, N., dan Lemmens, R.H.M.J. 1999. *Plant Resources of South-East Asia No 12 (1) Dalam: Medicinal and poisonous plant 1*. Backhuys Publishers, Leiden. Halaman 32.
- Devkatte, A.N., Zore, G.B., dan Karuppayil, S.M. 2005. Potential of Plant Oils as Inhibitor of *Candida albicans* Growth. *FEMS Yeast Research*. 5: 867-873.
- Dewoto, H.R. 2007. Pengembangan Obat Tradisional Indonesia Menjadi Fitofarmaka. *Maj Kedokt Indon*. 57(7):205-211.
- Direktorat Jenderal Pengembangan Ekspor Nasional. 2014. *Warta Ekspor*. Ditjen PEN/MJL/005/9/2014. Kementerian Perdagangan Republik Indonesia. Jakarta. Halaman 4.
- Duarte, M. R. Dan Silva, A.G. 2013. Anatomical Characters of the Medicinal Leaf and Stem of *Gymnanthemum amygdalinum* (Delile) Sch.Bip. ex Walp. (Asteraceae). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 49(4): 719-727.
- Gershenzon, J., McConkey, M.E., dan Croteau, R.B. 2000. Regulation of Monoterpene Accumulation in Leaves of Peppermint. *Plant Physiology*. 122:205-213.
- Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T. 2000. *An Introduction to Genetic Analysis*. Edisi ketujuh. W.H. Freeman and Company, New York. Halaman 337.
- Harbourne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Edisi kedua. Penerbit ITB, Bandung. Halaman 67.
- Houghton, P.J. dan Raman, A. 1998. *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts*. Chapman and Hall, London. Halaman 22.
- Kim, D., Shin, W.S., Lee, K.H., Kim, K., Park, J.Y. dan Koh, C.M. 2002. Rapid differentiation of *Candida albicans* from other *Candida* species using its unique germ tube formation at 39°C. *Yeast*. 19:957-962.
- Kool, A., de Boer, H.J., Kruger, A., Rydberg, A., Abbad, A., Bjork, L., dan Martin, G. 2012. Molecular Identification of Commercialized Medicinal Plants in Southern Morocco. *Plos One*. 7(6): e39459.
- Larone, D.H. 1995. *Medically Important Fungi: a Guid to Identification*. American Society for Microbiology, Washington. Halaman 219.

- Luo, X., Jiang, Y., Fronczek, F.R., Lin, C., Izebigie, E.B., dan Lee, K.S. 2011. Isolation and Structure determination of a Sesquiterpene Lactone (Vernodalinol) from *Vernonia amygdalina* extracts. *Pharm Biol.* 49(5): 464-470.
- Mohandas, V. Dan Ballal, M. 2011. Distribution of *Candida* Species in Different Clinical Samples and Their Virulence: Biofilm Formation, Proteinase and Phospholipase Production: A Study on Hospitalized Patients in Southern India. *Journal of Global Infectious Disease.* 3(1):4-8
- Molero, G., Diez-Orejaz, R., Navarro-Garcia, F., Monteoliva, L., Pla, J., Sanchez-Perez, M., dan Nombela, C. 1998. *Candida albicans*: Genetics, Dimorphism, and Pathogenicity. *International Microbiol.* 1:95-106.
- Murayama, S.Y., Negishi, Y., Umeyama, T., Kaneko, A. Oura, T., Niimi, M., Ubukata, K., dan Kajiwarra, S. 2006. Construction and Functional Analysis of Fatty Acid Desaturase Gene Disruptants in *Candida albicans*. *Microbiology.* 152:1551-1558.
- Natur Indonesia. 2012. *Daun Afrika Selatan*. <http://naturindonesia.com/indexphp/diabetes-militus/daun-afrika-selatan>. Diakses tanggal 16 September 2015.
- Obistioiu, D., Cristina, R.T., Schmerold, I., Chizzola, R., Stolze, K., Nichita, I., Chiurciu, V. 2014. Chemical Characterization by GC-MS and in vitro Activity *Candida albicans* of volatile fractions prepared from *Artemisia drunculus*, *Artemisia abrotanum*, *Artemisia absinthium*, and *Artemisia vulgaris*. *Chemistry Central Journal.* 8:6
- Palozza, P. Dan Krinsky, N.I. beta-Carotene and alpha-Tocopherol are Synergistic Antioxidants. *Arch Biochem Biophys.* 297(1):184-187.
- Pasteur, A.R., Ullmann, Y., dan Berdicevsky, I. 2011. The Pathogenesis of *Candida* Infections in a Human Skin Model: Scanning Electron Microscope Observations. *ISRN Dermatology*. doi:10.5402/2011/150642
- Pfaller, M.A., Moet, H.J., Messer, S.A., Jones, R.N., Castanheira, M. 2011. Geographic Variations in Species Distribution and Echinocandin and Azole Antifungal Resistance Rates Among *Candida* Bloodstream Infection Isolates: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009). *J Clin Microbiol.* 49(1):396-399.
- Pittsburgh Plate Glass. 2003. *Methylene Chloride*. www.ppgcloralkali.com. diakses tanggal 13 Juli 2015.
- Rao, A., Zhang, Y., Muend, S., dan Rao, R. 2010. Mechanism of Antifungal Activity of Terpenoid Phenols Resembles Calcium Stress and Inhibition of the TOR Pathway. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 54(12): 5062-5069.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan organik Tumbuhan Tinggi*. Edisi keenam. Penerbit ITB, Bandung. Halaman 134.

- Sarachek, A. dan Higgins, N.P. 1972. Effects of Ergosterol, Palmitic Acid, and Related Simple Lipids on the Recovery of *Candida albicans* from Ultraviolet Irradiation. *Arch. Mikrobiol.* 82:38-54.
- Shu, M., Ellepola, A.N.B., dan Samaranayake, L.P. 2001. Effects of Two Different Growth Media on the Postantifungal Effect Induced by Polyenes on *Candida* Species. *Journal of Clinical Microbiology.* 39(7):2732-2735.
- The National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2004. *Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline*. NCCLS document M44-A. NCCLS, Pennsylvania.
- United States Department of Agriculture. 2015. *Gymnanthemum amygdalinum* (Delile) Sch.Bip. Dalam: Germplasm Resources Information Network (GRIN) Taxonomy for Plants. <http://www.ars-grin.gov/4/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?419854>. Diakses tanggal 23 Agustus 2015.
- Wallerger, C., Juen, A., Staudacher, K., Schallhart, N., Mitternützner, E., Steiner, E.M., Thalinger, B., dan Traugott, M. 2012. Rapid Plant Identification Using Species- and Group-Species Primers Targeting Chloroplast DNA. *Plos One.* 7(1):e29473
- Xiang, J. 2014. *Nan Fei Shu, Daun Obat Para Raja*. <http://www.jia-xiang.biz/nan-fei-shu-daun-obat-para-raja/>. Diakses tanggal 16 September 2015.
- Yucesoy, M., Guldaz, N.S., dan Yulug, N. 2001. Disk Diffusion Method for Fluconazole Susceptibility Testing of *Candida albicans* Strains. *J Chemother.* 13(2):161-166.
- Zore, G.B., Thakre, A.D., Jadhav, S., dan Karuppayil, S.M. 2011. Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. *Phytomedicine.* 18:1181-1190
- Zwenger, S. dan Basu, C. 2008. Plant Terpenoids: Applications and Future Potentials. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews.* 3(1): 1-7.